

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3777389号

(P3777389)

(45) 発行日 平成18年5月24日(2006.5.24)

(24) 登録日 平成18年3月10日(2006.3.10)

(51) Int. Cl.		F I
C07K 14/415	(2006.01)	C07K 14/415
C07K 1/02	(2006.01)	C07K 1/02
C07K 1/14	(2006.01)	C07K 1/14
C12P 17/16	(2006.01)	C12P 17/16
A23J 3/14	(2006.01)	A23J 3/14

請求項の数 1 (全 8 頁) 最終頁に続く

<p>(21) 出願番号 特願平7-511819</p> <p>(86) (22) 出願日 平成6年9月21日(1994.9.21)</p> <p>(65) 公表番号 特表平9-506076</p> <p>(43) 公表日 平成9年6月17日(1997.6.17)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US1994/010696</p> <p>(87) 国際公開番号 W01995/010529</p> <p>(87) 国際公開日 平成7年4月20日(1995.4.20)</p> <p>審査請求日 平成12年8月22日(2000.8.22)</p> <p>(31) 優先権主張番号 08/135,194</p> <p>(32) 優先日 平成5年10月12日(1993.10.12)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 アーチャー ダニエルズ ミッドランド カンパニー アメリカ合衆国 イリノイ州 62526 ディケイター ファリエス パークウェイ 4666</p> <p>(74) 代理人 弁理士 中村 稔</p> <p>(74) 代理人 弁理士 大塚 文昭</p> <p>(74) 代理人 弁理士 熊倉 禎男</p> <p>(74) 代理人 弁理士 穴戸 嘉一</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アグルコンイソフラボン濃縮植物タンパク質濃縮物及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

植物タンパク質原料からアグルコンイソフラボン濃縮タンパク質濃縮物を製造する方法であって、

(a) グルコンイソフラボンを含む植物タンパク質原料を、pH 4.0 ~ 5.0を有する水性溶媒で洗浄して、グルコンイソフラボンを含む植物タンパク質濃縮物を製造し、

(b) ベータ-グルコシダーゼ酵素を前記植物タンパク質濃縮物に添加し、そして

(c) 前記グルコンイソフラボンを、前記ベータ-グルコシダーゼ酵素と、2 ~ 24時間、40 ~ 60の温度で且つ4.0 ~ 8.0のpHで接触させ、前記濃縮物中の該グルコンイソフラボンの少なくとも80%をアグルコンイソフラボンへ変換してアグルコンイソフラボン濃縮タンパク質濃縮物を製造する事を特徴とする方法。

10

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、植物タンパク質原料を洗浄して植物タンパク質濃縮物を製造し、大部分のグルコンイソフラボンをアグルコンイソフラボンに変換し、濃縮したタンパク質濃縮物中に保持されるような条件下で、1種以上のベータ-グルコシダーゼ酵素で処理することによる、アグルコンイソフラボン濃縮植物タンパク質濃縮物の製造に関する。本願は、米国特許出願第08/135,194号(出願日1993年10月12日)の一部継続出願である。

発明の背景

イソフラボンは、大豆のような植物タンパク質原料を含む、さまざまなマメ科の植物に存

20

在する。これらの化合物には、ダイジン(daidzin)、6"-OAcダイジン、6"-OMalダイジン、ダイゼイン(daidzein)、ゲニスチン(genistin)、6"-OAcゲニスチン、6"-OMalゲニスチン、ゲニステイン(genistein)、グリシチン(glycitin)、6"-OAcグリシチン、6"-OMalグリシチン、グリシテイン(glycitein)、ピオカニン A (biochanin A)、ホルムオノネチン(formononetin)及びクメストロール(coumestrol)が挙げられる。典型的にはこれらの化合物は大豆独特の苦味と関係があり、工業製品、例えば単離物及び濃縮物などの製造において、興味

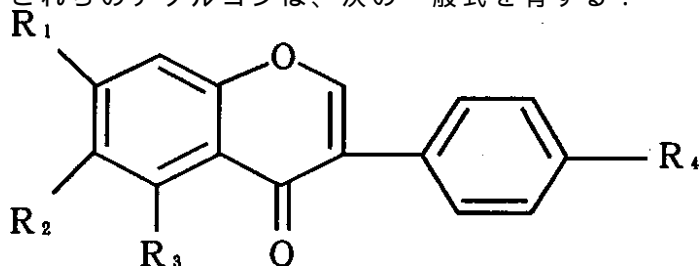
10

の中心はこれらの物質を除去することにある。例えば、水性アルカリ性溶媒で大豆フレークを抽出する従来の大豆タンパク質単離物の製造方法において、多量のイソフラボンは抽出物中に溶解し、かつ乳漿(whey)中に溶解して残存し、該乳漿は通常、タンパク質の酸沈殿の次に捨てられて単離物を形成する。酸沈殿されたタンパク質単離物に残っている残存イソフラボンは通常、単離体を激しく洗浄することによって除去される。大豆のような植物タンパク質に含まれるイソフラボンは、次の文献に記載されるように、乳ガン細胞及び前立腺ガン細胞のようなヒトのガン細胞の成長を阻害できると、最近考えられている。ペターソン(Peterson)及びバーズ(Barnes)、Biochemical and Biophysics Research, Communications 179巻(No.1)、661-667頁、1991年8月30日 "Genistein Inhibition of the Growth of Human Breast Cancer Cells, Independence from Estrogen Receptors and the Multi-Drug Resistance Gene" ; ペターソン (Peterson) 及びバーズ (Barnes)、The Prostate、22巻、335-345頁(1993年) "Genistein and Biochanin A Inhibit the Growth of Human Prostate Cancer Cells but not Epidermal Growth Factor Receptors Tyrosine Auto-phosphorylation" ; 及びバーズ (Barnes) ら、Mutagens and Carcinogens in the Diet、239-253頁 (1990年) "Soybeans Inhibit Mammary Tumors in Models of Breast Cancer" 。

20

上記のイソフラボンのうち、いくつかは、次に示す式の7位にグルコース分子が結合したグルコシドとして、又はグルコンとして存在する。6"-OAcゲニスチンのようないくつかのグルコンは、グルコース分子それ自身の6位に付いたアセテート基を含んでいる。グルコシドを含むすべてのイソフラボンは、医学的評価の関心事である一方、最大の関心事は、特定のイソフラボン、即ちグルコース分子が結合していないアグルコンにある。これらのイソフラボンは、グルコン又はグルコシドのような水溶性ではない。このカテゴリーに入る特定のイソフラボンとして、ダイゼイン、ゲニスチン、及びグリシテインが挙げられる。これらのアグルコンは、次の一般式を有する：

30



式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 は、H、OH及び OCH_3 からなる群から選ぶことができる。したがって、本発明は、アグルコン及びそれらの物質を有する植物タンパク質濃縮物の濃縮化に関する。

40

グルコンイソフラボンをアグルコンイソフラボンに変換する方法は、既に当業界で知られており、オバタ(Obata)らの日本国特許第258,669号等に記載されている。これらの方法は、単に適度な変換を達成するのみであり、特に大規模工業生産には望ましくない。また、'669特許に記載されるような既知の方法は、タンパク質原料からイソフラボンを除去することを教示しているが、アグルコンイソフラボン濃縮タンパク質濃縮物をどのようにして調製するのかということについては記載していない。したがって、少なくとも大部分の、好ましくは実質的にすべてのグルコンイソフラボンをアグルコンイソフラボンに変換する方法、及びアグルコンイソフラボン濃縮植物タンパク質濃縮物を製造する方法が必要となる。

ゆえに、本発明の目的は、アグルコンイソフラボン濃縮タンパク質濃縮物及びその製造す

50

る方法を提供することにある。この目的及びその他の目的は、以下の本発明の詳細な説明によって、特に達成される。

発明の概要

本発明は、アグルコンイソフラボン濃縮植物タンパク質濃縮物及びその製造方法を提供する。この製造方法は、グルコンイソフラボンを含む植物タンパク質原料を該タンパク質原料の等電点付近のpHを有する水性溶媒で洗浄して植物タンパク質濃縮物を製造する工程を有する。その後、該濃縮物中の少なくとも大部分のグルコンイソフラボンをアグルコンイソフラボンに変換するのに十分な時間、温度、及びpHで、該濃縮物を十分量の1種以上のベータ-グルコシダーゼ酵素と反応させて、それによってアグルコンイソフラボン濃縮タンパク質濃縮物を製造する。本発明は、補足的な(supplemental)ベータ-グルコシダーゼを洗浄物又は濃縮物に添加する、濃縮物の製造方法も提供する。得られたアグルコン濃縮化濃縮物を、その後分離し、脱水することができる。さらに、本発明は、植物タンパク質原料から、タンパク質濃縮物中に比較的高い比率でイソフラボンを回収する方法も提供する。

10

好ましい態様の説明

本発明は大豆生成物に関して記載しており、かつ本方法はアグルコンイソフラボン濃縮化濃縮大豆原料の製造に特に好適であるが、それにも関わらず、本方法は、イソフラボンを含むさまざまな植物タンパク源からのアグルコンイソフラボン濃縮化濃縮物の製造に一般的に適用できる。好適な植物タンパク質原料の例として、マメ科原料、大豆原料、又は大豆を含む植物タンパク質原料が挙げられる。本明細書で用いられる『大豆原料』という語は、大豆又はあらゆる大豆誘導体を指すものである。

20

好ましい態様の濃縮物に関する出発原料は、溶媒抽出で油が除去されている大豆フレークである。典型的には、大豆フレークをそのタンパク質の等電点付近のpHを有する水性溶媒で洗浄することにより、大豆フレークから大豆タンパク質濃縮物を製造する。大豆タンパク質の場合、等電点は約4.4~4.6である。典型的には、食用の酸をその水に加えて、大豆タンパク質原料のための等電洗浄液(isoelectric wash)を提供する。この等電洗浄液は、水溶性の炭水化物及び他の成分を多量に除去するが、該タンパク質を全く除去せず、それによってタンパク質濃縮物を提供する。該タンパク質濃縮物は典型的には、乾燥基準で約60~70重量%の含量でタンパク質を有するであろう。植物タンパク質又は大豆原料に含まれるグルコンイソフラボンは、等電洗浄液によって除去される。しかし、比較的低いpHでは、除去される量は、より高いpHでの抽出物より少ない。ゆえに、好ましい態様のために、かつイソフラボンの最大限の回収の範囲において、等電点での洗浄を1段階に限定するか、又は多くとももう1回等電点で洗浄を行うのが好ましい。タンパク質原料を洗浄するのに用いる水性溶媒：タンパク質原料の量の重量比は、約5:1~約10:1であるのが好ましい。

30

得られた濃縮物を、固形分約10~約15重量%のレベルで水に懸濁し、その後、1種以上のベータ-グルコシダーゼ酵素と反応させて、濃縮物に含まれるグルコンイソフラボンの少なくとも大部分、好ましくは実質的にすべてをアグルコンイソフラボンに変換する。ベータ-グルコシダーゼ酵素の最適なpH範囲は、用いる特定のベータ-グルコシダーゼ酵素に依存するであろうが、代表的には約4~約8の間で変化するであろう。典型的には、抽出物のpHを、酵素との反応前に特定の酵素が最も活性であるpH範囲付近に調整する。典型的には、食用の酸、例えば酢酸、硫酸、リン酸、塩酸又は他の好適な試薬などを添加することにより、pHを調整する。

40

ベータ-グルコシダーゼ酵素は、大豆原料に天然に存在するもの、又は本明細書で『残余』酵素とよばれる微生物増殖からのものであってもよく、又は濃縮物に添加するものであってもよい。添加される酵素は、本明細書で『補足的酵素』と称する。一般に、グルコン形態のイソフラボンの少なくとも大部分、好ましくは実質的にすべてをアグルコン形態に変換するのに濃縮物中の残余酵素の濃度が不十分なとき、補足的酵素を添加すべきである。イソフラボンの変換を行うのに十分な酵素の量は、存在する酵素のタイプ、酵素濃度の分布、系のpH、及び存在する酵素の活性を含む多数の因子によって変化する。酵素の濃

50

度が、残余酵素、補足的酵素、又はその両者により十分に存在するとき、濃縮物に含まれるグルコンイソフラボンの少なくとも大部分、好ましくは実質的にすべてをアグルコン形態に変換するのに十分な時間、温度、及びpHで、濃縮物をベータ-グルコシダーゼ酵素と反応させる。

好ましい補足的ベータ-グルコシダーゼ酵素には、バイオペクチナーゼ(Biopectinase) 100L及び300L、バイオペクチナーゼOK 70L、ラクターゼF、並びにラクトザイム(Lactozyme)が挙げられる。ラクターゼFは、アマノ国際酵素株式会社(Amano International Enzyme Co, Inc., P.O.Box 1000 Troy, VA 22974)で市販するものであり、最適pH範囲が約4~約6である。ラクトザイムは、ノボ社(Novo Industries, Enzyme Division, Novo Alle, DK 2880 Bagvaerd, Denmark)で市販するものであり、最適pH範囲が約7である。バイオペクチナーゼ100L、バイオペクチナーゼ300L、及びバイオペクチナーゼOK 70Lは、クエストインターナショナル(Quest International, Sarasota, Florida)から入手可能である。少なくとも大部分の、好ましくは実質的にすべてのグルコンイソフラボンをアグルコンに変換するのに十分な量で、補足的酵素を添加する。補足的酵素を添加する必要がある場合には、添加する酵素量は、乾燥基準でタンパク質濃縮物の約0.5重量%~約5重量%である。

補足的酵素として投与するのに好適な酵素の他の種類として、エステラーゼ酵素が挙げられる。これらの酵素は、イソフラボン共役体(conjugate)からアセテート及びマロネート基を除去することにより、アセテート及びマロネート共役体をグルコンイソフラボンに変換するので、本明細書に記載した好ましい態様の方法に十分に好適であると考えられている。最も好ましい態様として、ベータ-グルコシダーゼ及びエステラーゼの双方のタイプを用いるものがよい。

好ましい態様の方法として、1段階工程が好ましく、比較的短時間、比較的容易かつ経済的に、非常に高い程度でイソフラボンの変換(グルコン形態からアグルコン形態への変換)を達成する。本明細書で用いられる『1段階』反応工程という語は、ある種の工程パラメータ値が、その反応工程にわたって一般的に維持されている反応工程を意味している。これらの工程パラメータには、pH及び温度が含まれる。

非常に高い程度の変換とは、濃縮物中に存在するグルコン形態のイソフラボンの少なくとも大部分、好ましくは実質的にすべてをアグルコン形態に変換するようなことをいう。『大部分』という語は、グルコンイソフラボンからアグルコンイソフラボンへの変換が少なくとも約50%である程度をいう。『実質的にすべて』という語は、グルコンイソフラボンからアグルコンイソフラボンへの変換が少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90%である程度をいう。

ある特定の理論に結合しているものではないが、本明細書に記載した方法の驚くべき、かつ予期せぬ高い程度の変換は、1段階反応工程の際に用いた工程パラメータの組合せによる結果であると考えられている。反応系のpHを、約4~約8の値に維持するか、又はほぼその値にするのが好ましく、最も好ましくは、1段階反応工程の際にイソフラボン共役体との反応前で酵素が最も活性である値に維持するか、又はほぼその値にするのがよい。反応系の温度を、約40~約60の温度に維持するか、又はほぼその値にするのが好ましく、最も好ましくは、1段階工程の際に約60という温度に維持するか、又はほぼその値にするのがよい。本明細書に記載される1段階工程を介しての、実質的にすべてのグルコンイソフラボンからアグルコンへの変換を達成するのに必要な時間は一般的に、約2時間~約24時間である。

アグルコン濃縮化濃縮物を提供する他の方法は、大豆出発原料を等電洗浄液に懸濁して、上記のラクターゼFのような等電点付近の最適pHを有する1種以上のベータ-グルコシダーゼを該スラリーに直接添加する、等電点での洗浄とベータ-グルコシダーゼでの反応とを結合して1段階にする方法である。その後、前述の一般的な条件下で反応を行い、少なくとも大部分の、好ましくは実質的にすべてのグルコンイソフラボンをアグルコンに変換する。これは、好ましく、かつ簡単な方法であり、これにより、始めに等電点で原料を洗浄し、可溶性の炭水化物を除去する工程がないため、それによって洗浄によりイソフラ

10

20

30

40

50

ボンが減少するあらゆる可能性を避けることができる。

遠心分離及び乾燥技術を含む従来の方法によりタンパク質濃縮物を脱水して、ゲニスチンを乾燥基準で約1.0～約2.0mg / グラム、ダイゼインを乾燥基準で約0.7～約1.5mg / グラム有する濃縮物を提供することができる。

本発明は、大豆原料のような植物タンパク質原料から、タンパク質濃縮物中に非常に高い比率でイソフラボンを回収する方法も提供する。本明細書に記載される方法により得られる回収レベルは典型的には、出発植物タンパク質原料中の特定のイソフラボンのすべての形態全体をベースとして、少なくとも50%、好ましくは65%、及び最も好ましくは80%である。ある特定の理論に結合するものではないが、高い回収は、本明細書に記載されたさまざまな処理手順と結合した、本明細書に記載した変換反応から生じるものと考えられる。ある特定の処理段階で、比較的溶解性であるグルコンイソフラボン共役体を溶解性のないアグルコン形態に変換することによって、供給原料から得られた生成物中に、高いパーセンテージでイソフラボンを回収することができる。

以下の実施例は、本発明の特定の態様を説明するものであって、それに限定されるものではない。

実験

大豆ミール15グラム及び水150グラムの混合物をpH 7に調整した。バイオペクチナーゼ100L 1.5グラムをこの混合物に添加した。混合物を60℃で2時間培養した。但し、その時間のpHを4.5に調整した。さらにバイオペクチナーゼ100Lを1グラム添加して、得られた混合物を2時間培養した。培養後、得られたアグルコンイソフラボン濃縮タンパク質 / 繊維濃縮物を回収した。タンパク質 / 繊維濃縮物中のイソフラボンの回収率を以下の表1に示す。

10

20

表 1

サンプル	ゲニス チン %	6"-OMAL- ゲニスチン %	6"-OAC- ゲニスチン %	ゲニス チン %	ダイジン %	6"-OMAL- ダイジン %	6"-OAC- ダイジン %	ダイゼ イン %	グリシ チン %	6"-OMAL- グリシチン %	グリシ チン %
1段階変換 出発原料	48	49	0	3	47	47	1	4	43	41	16
タンパク質/繊維濃縮物	8	27	0	66	7	23	0	70	50	15	35

これらのデータから、残余酵素及び補足的酵素の組合せによって達成できる変換の程度が

10

20

30

40

50

わかる。イソフラボンの著しい変換は、発生したアグルコン、特にゲニステイン及びダイゼインに結びつけられる。本明細書で記載されるイソフラボンの各タイプの濃度は、イソフラボンのタイプのすべての形態の全体をベースとしている。

他の一連の実験において、大豆由来のタンパク質濃縮物中のゲニステイン及びダイゼインの回収パーセントを調査した。単離物中のゲニステイン（又はダイゼイン）の量を測定して、大豆出発原料中のゲニステイン（又はダイゼイン）のすべての形態の全体をベースにしたパーセンテージで表すことにより、回収パーセントを見出した。脱脂大豆粉100gを、塩酸を添加することによりpHを4.5に調整した水1600gに入れた。このスラリーを50

に加熱し、ベータ-グルコシダーゼ活性を有する酵素、特にラクターゼFを、カード(curd)の乾燥重量の2重量%の量で添加した。このスラリーを50で16時間反応させて、グルコンイソフラボンからアグルコン形態への完全な変換を確実なものとした。遠心分離によりタンパク質濃縮物を水性溶媒から分離して、アグルコン濃縮化濃縮物を形成した。濃縮物をさらに洗浄しなかった。単離物中に回収したゲニステインの量は、出発大豆原料(脱脂大豆粉)中のゲニステイン及びゲニスチンのすべての形態の全体の82%であった。同じように、単離物中に回収したダイゼインの量は、64%であった。

大豆生成物中のイソフラボンを定量化する方法を次に説明する。サンプル0.75g(噴霧乾燥したもの又は微粉末)をメタノール/水=80/20の溶媒50mlと混合することにより、イソフラボンを大豆生成物から抽出した。この混合物をオービタルシェーカー(orbital shaker)で2時間室温で振盪した。2時間後、残存する非溶解物質をワットマン42番濾紙で濾過して除去した。濾液5mlを水4ml及びメタノール1mlで希釈した。

抽出したイソフラボンを、ベックマンC18逆相カラムを用いて、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)で分離した。イソフラボンをカラム上に注入し、メタノール88%、水10%及び氷酢酸2%で開始し、メタノール98%及び氷酢酸2%で終了する勾配溶媒で溶出した。流速0.4ml/分で、すべてのイソフラボン、即ちゲニスチン、6"-0-アセチルゲニスチン、6"-0-マロニルゲニスチン、ゲニステイン、ダイジン、6"-0-アセチルダイジン、6"-0-マロニルダイジン、ダイジン、グリシチン及びその誘導体並びにグリシテインは、きれいに溶解した。ピーク検出は、262nmでの紫外線吸光度による。ピークの同定を質量分析計で行った。

インドファイン化学会社(Indofine Chemical Company, Sommerville, NJ)から購入した純粋標準試薬(ゲニスチン、ゲニステイン、ダイジン及びダイゼイン)を用いて、定量化を達成した。上記化合物のそれぞれについて、応答因子(集積領域/濃度)を計算し、未知のサンプルを定量化するのに用いた。純粋標準試薬が入手できない共役体については、応答因子を親分子のものと推定し、分子量の違いを補正した。グリシチンに対する応答因子は、分子量の違いを補正したゲニスチンの応答因子と推定した。

この方法により、それぞれ個々のイソフラボンの定量化をもたらす。すべての共役体が、それぞれの非共役体に変換されるのであれば、便宜的に、全ゲニステイン、全ダイゼイン及び全グリシテインを上記のデータから計算することができ、それらの化合物の凝集体重量を表示することができる。酸加水分解を用いて共役体に変換する方法により、これらの合計を直接に測定することもできる。

前述の記載はもちろん、本発明の単に好ましい実施態様であって、添付した請求の範囲に示す精神及びその広範囲の面から離れなければ、さまざまな変化又は変更をすることができると考えられ、添付した請求の範囲は、均等論を含む特許法の原則により解釈すべきであると考えられる。

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 2 3 J 3/34 (2006.01) A 2 3 J 3/34

(74)代理人

弁理士 小川 信夫

(74)代理人

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 シェン ジェローム エル

アメリカ合衆国 ミズーリー州 6 3 1 0 9 セント ルイス キース プレイス 5 9 3 7

(72)発明者 ブライアン バーバラ エイ

アメリカ合衆国 ミズーリー州 6 3 1 3 0 ユニヴァーシティー シティー パーシング アベ
ニュー 7 0 3 9

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 特開平01 - 258669 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/415

C07K 1/14